



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA



SABRINA ALMEIDA CAMPÊLO

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Phaseolus lunatus* L. (FEIJÃO-FAVA)
MEDIANTE DIFERENTES TRATAMENTOS DE CONSERVAÇÃO DA FOLHA

EXTRACTION OF DNA FROM *Phaseolus lunatus* L. (LIMA BEANS)
USING DIFFERENT LEAF CONSERVATION TREATMENTS

PARNAÍBA

2024

SABRINA ALMEIDA CAMPÊLO

**EXTRAÇÃO DE DNA DE *Phaseolus lunatus* L. (FEIJÃO-FAVA)
MEDIANTE DIFERENTES TRATAMENTOS DE CONSERVAÇÃO DA FOLHA**

**EXTRACTION OF DNA FROM *Phaseolus lunatus* L. (LIMA BEANS)
USING DIFFERENT LEAF CONSERVATION TREATMENTS**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina da Universidade Federal
do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis
Velloso, como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Francilene Leonel
Campos**

PARNAÍBA

2024

SABRINA ALMEIDA CAMPÊLO

**EXTRAÇÃO DE DNA DE *Phaseolus lunatus* L. (FEIJÃO-FAVA)
MEDIANTE DIFERENTES TRATAMENTOS DE CONSERVAÇÃO DA FOLHA**

**EXTRACTION OF DNA FROM *Phaseolus lunatus* L. (LIMA BEANS)
USING DIFFERENT LEAF CONSERVATION TREATMENTS**

Aprovado em: 10/07/2024

BANCA EXAMINADORA:

**Prof^ª. Dra. Francilene Leonel Campos
Orientadora**

**Prof^ª. Dra. Renata Canalle
1º Examinador**

**Msc. Renata Brito Reis
2º Examinador**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
MATERIAIS E MÉTODOS	7
RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIAS	12
ANEXO	14

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Phaseolus lunatus* L. (FEIJÃO-FAVA) MEDIANTE DIFERENTES TRATAMENTOS DE CONSERVAÇÃO DA FOLHA

EXTRACTION OF DNA FROM *Phaseolus lunatus* L. (LIMA BEANS) USING DIFFERENT LEAF CONSERVATION TREATMENTS

Sabrina Almeida Campêlo¹, José Rodolpho de Sousa Lopes², Francilene Leonel Campos³

^{1,3} Universidade Federal do Delta do Parnaíba- UFDPAr, Parnaíba, Piauí

² Professor Licenciado em Ciências Biológicas - SEDUC Piriipiri, Piauí

RESUMO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma leguminosa produzida em diversas partes do mundo, sendo muito resistente ao clima semiárido. O isolamento do seu DNA visa aprimorar o conhecimento e os estudos sobre seu genoma, induzindo o seu melhoramento e divulgando e fortalecendo ainda mais o seu plantio. Objetivou-se com este trabalho encontrar a melhor forma de preservar a folha de *Phaseolus lunatus* L. para que seja possível extrair boa quantidade de DNA, em sua forma mais pura utilizando o protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) utilizando folhas secas e frescas. Na espectrofotometria que visa medir a pureza da amostra, indicando o quanto a amostra está contaminada de acordo com o comprimento de onda, não houve resultado fora do parâmetro base, ao comparar os objetos de estudo da extração realizada com o tecido foliar seco, obteve-se uma maior quantidade de resultados, dentro dos parâmetros sugeridos pelos autores, quando correlacionado com o fresco. Quando analisado o parâmetro 1,8 a 2,2 no comprimento de onda 260/280, onde na amostra de tecido foliar fresco houve uma amostra que passou do parâmetro utilizado como base. Os resultados obtidos referentes ao comprimento de onda 260/230, no tecido foliar seco, encontraram-se dentro dos parâmetros bases nas extrações realizadas, tendo apenas duas amostras fora do critério 1,6- 1,9, enquanto as folhas frescas tiveram seis amostras. Assim, se justifica, a extração de DNA com conservação do tecido foliar seco, como a forma de conservação de amostras foliares mais promissoras na extração de DNA *Phaseolus lunatus* L.

Palavras-chave: Adaptação de Protocolo, Biologia Molecular, Genética.

ABSTRACT

The lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is a legume produced worldwide, known for its resilience to semi-arid climates. The isolation of its DNA aims to enhance understanding and research into its genome load, facilitating its improvement and promoting and strengthening its cultivation. This study aims to optimize the preservation of *Phaseolus lunatus* L. leaves to achieve high-quality DNA extraction using the protocol outlined by Dellaporta *et al.* (1983), employing both dried and fresh leaves. In spectrophotometry that aims to measure the purity of the sample, indicating how contaminated the sample is according to the wavelength, there was no result outside the base parameter, when comparing the study objects of the extraction carried out with the dry leaf tissue, we obtained- a greater number of results, within the parameters suggested by the authors, when correlated with freshness. When analyzing the parameter 1.8 to 2.2 at wavelength 260/280, where in the fresh leaf tissue sample there was a sample that exceeded the parameter used as base. Regarding the 260/230 wavelength ratio, dried leaf tissue extraction mostly met the 1.6-1.9 criterion, with only two exceptions, whereas fresh leaves showed six samples outside this range. Therefore, preserving DNA with dried leaf tissue is justified as the most promising method for *Phaseolus lunatus* L. DNA extraction.

Keywords: Genetics, Molecular Biology, Protocol Adaptation.

INTRODUÇÃO

O Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) também é conhecido como fava, feijão-de- lima, fava lima, feijão rajada (Junqueira *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010) com $2n= 22$, é uma leguminosa de grande valor nutricional, sendo uma ótima fonte proteica, sendo assim, um dos principais itens de dieta de diversas populações na América do Sul, África e México. Em todo o Brasil, mas principalmente no Nordeste seu plantio é realizado em consórcio com outras espécies, como o milho, mandioca ou mamona, que servem como suporte (Azevedo *et al.* 2003; Feitosa *et al.*, 2011).

Essa espécie que possui forte adaptação ao clima semiárido, dentre outras características, como, sua rusticidade, promover colheita até em climas mais secos, elevado poder alimentício e custo econômico, em especial para pequenos agricultores das regiões de onde provêm. Essas características reafirmam sua valiosidade e importância no meio de cultura de diversas comunidades. Segundo Nobre e Júnior (2011) a fava pode se apresentar em forma de arbustos, com exceção àquelas variedades com crescimento determinado, onde é facilitada a colheita mecânica, contudo, por ainda ser pouco comercializada no Brasil, a colheita é feita pela agricultura familiar, ocorrendo de forma manual.

Dada sua importância, é nítida a necessidade de se estudar suas características genéticas a fim de se obter informações a cerca de explorar sua diversidade gênica e consequentemente o aumento da variabilidade, que acarretem a ganhos expressivos por meio do melhoramento, proporcionando melhores condições de adaptação climática, resistência a pestes e até um panorama de seus nutrientes bem como pode ser adicionada na nutrição de populações menos favorecidas proporcionando uma alimentação equilibrada (Amabile, 2018).

Marcos Filho (2005) afirma que, um genótipo que forneça uma maior capacidade em translocar e armazenar nutrientes na semente tem maior potencial em produzir sementes com elevado poder germinativo e vigor de plântulas sob condições adversas de estresses bióticos e abióticos. Com o auxílio de novas tecnologias, como as relacionadas à biologia molecular, é possível realizar estudos minuciosos sobre essa leguminosa possibilitando a exploração de todo seu potencial. Para que seja realizada sua extração de DNA é de suma importância entender como melhor conservar a amostra que será estudada. Em cada espécie há uma (ou mais) formas de conservação, necessitando muitas vezes de adaptações e modificações para que se consiga resultados à pesquisa.

Este trabalho sucedeu-se utilizando protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) com modificações, pois, além de ser uma forma de testar um protocolo até então pouco utilizado quanto a extração de DNA de vegetais, segundo Lopes *et al.* (2021) é uma técnica mais rápida, barata e mais simples que a normalmente utilizada, a de Doyle e Doyle (1987). É importante realizar diversos testes quanto a utilização de novos protocolos a fim de otimizar tempo, dinheiro e complexidade. Principalmente em laboratórios de pequeno porte que não possuem recursos financeiros para grandes investimentos, mas ainda querem contribuir equivalentemente na realização de pesquisas.

Dentre as formas de conservação podemos destacar a desidratação (utilizando sílica em gel), segundo um estudo realizado por Pereira *et al.* (2009), utilizando esse tipo de conservação de material biológico, as amostras foram conservadas em sílica a fim de moderar a umidade relativa do saco plástico onde foram acondicionadas. Outra forma de conservação é aquela em que as amostras são congeladas em nitrogênio líquido, muito utilizado segundo Ferreira e Grattapaglia (1988), quando o local da coleta é distante do local da extração, evitando assim possível oxidação e perda da amostra; Por fim, a conservação em Gel CTAB.

Esta pesquisa considera duas formas de conservação da folha do Feijão-fava para a realização da extração de DNA, que são: fresca e seca. Ferreira e Grattapaglia (1988) ressaltam a importância do material a ser utilizado para que a extração seja o mais fresco possível para melhores resultados na extração de DNA.

De acordo com Martins e Barbosa (2020), realizaram um estudo com *Geissospermum urceolatum*, popularmente conhecido como Acarirana ou acariquara-branca, utilizando a folha fresca da espécie conservada em sílica para a extração do DNA, ela se mostrou oxidada tornando a amostra de baixa qualidade para a obtenção de DNA, contudo, quando a amostra foi coletada e conservada em sacos plásticos e resfriadas em isopor com gelo por 24h à 48h, como resultado o DNA mostrou-se de alta qualidade.

O trabalho de Rocha *et al.* (2018) abordam que a idade da folha utilizada na extração de DNA da espécie interferiu na qualidade de DNA, obtendo-se melhores resultados no processo com folhas jovens, todavia com folhas remanescentes “houve produção de DNA contaminado por proteína e polifenóis em algumas amostras”. Com isso, entende-se a importância da escolha do material a ser utilizado e sua forma de preservação.

Após a extração é realizada a espectrofotometria a fim de observar a quantidade de DNA extraído e seu grau de pureza. Essa técnica utiliza um feixe de luz que poderá se refletido ou absorvido pela solução da amostra, medindo intensidade que a substância absorveu do feixe de luz. (Kasvi, 2018). A amplitude do reflexo é mede quantitativamente o grau da absorbância do composto utilizado.

Assim, torna-se importante estudar a melhor forma de conservação da amostra a fim de manter o DNA com qualidade para as próximas etapas de estudo. O presente trabalho objetivou analisar e comparar as diferentes estratégias de conservação da folha, podendo ser elas frescas ou secas, para extração de DNA em *Phaseolus lunatus* L. (Feijão-fava).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o cultivo do Feijão- fava oriundo de variedades de cultivo tradicional da região meio norte do estado do Piauí e/ou do banco de germoplasma da UFPI, em outubro de 2023 em tecido foliar fresco e em Janeiro de 2024 em tecido foliar seco, tendo esta secado em estufa por 48 horas. Com aproximadamente 15 dias, folhas jovens foram coletadas e realizada a extração de DNA das amostras. Foi realizada duas extrações no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Pós-Graduação da UFDPAr/ CMRV.

O protocolo utilizado foi o de Dellaporta *et al.* (1983) com modificações sugeridas por Lopes *et al.* (2021). Dentre as modificações podem ser citadas: o aumento da quantidade de amostra utilizada, de 0,0200g- 0,0300g para 0,0400g- 0,0500g; a incubação do material passou de 1h à -20°C para uma média de 20 a 30 min em -30°C. Essas modificações se justificam ao levar em consideração os valores obtidos pelo autor e adaptação ao laboratório em que foi realizado o estudo.

O experimento consistiu inicialmente em preparar a numeração nos eppendorfs de 2,0 ml e 1,5ml, pesagem as amostras coletadas, de 0,0400 g a 0,0500 g e em ligar o banho-maria a 60-64 °C. Posteriormente, colocou-se 600 µL de tampão de extração no eppendorf de 2,0 ml e levou-se ao banho-maria por 10 minutos. Após pesado o material, os mesmos foram macerados e adicionado o tampão de extração pré- aquecido. O próximo passo foi adicionar 50 µL de SDS 20%, misturar por inversão e incubar em banho-maria por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 200 µL KOAc (Acetato de Potássio) 5M e os incubou no gelo por 20 minutos. Centrifugou-se a 8.290 rpm durante 5 minutos, a 4°C.

Foi realizada a transferência do sobrenadante para tubo novo, de 1,5 ml. Seguidamente acrescentou-se 700µl de isopropanol gelado e foi realizada a incubação por 30 minutos, a -30°C. Após a incubação foram levados para centrifugar a 8.290 rpm durante 5 minutos, a 4°C, descartado o sobrenadante. Logo após foi adicionado ao DNA precipitado 100µl de NaOAc (Acetato de Sódio) 3M e 700µl isopropanol gelado, misturando por inversão. Foram levados a incubação por 30 min, a -30°C. Em seguida, as amostras foram levadas à centrifugação e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com etanol 70% e posteriormente com

etanol 95%. Por fim deixou-se secar a temperatura ambiente até o dia seguinte. No segundo dia as amostras foram ressuspensas em 50µl de H2O Milli-Q.

Posteriormente a extração foi realizada a análise quantitativa no espectrofotômetro BioSpec-Nano (Spectrophotometer for Life Science) que é apropriado para as verificações da concentração de ácido nucleico de DNA e RNA das amostras. Tem funcionalidade rápida e de fácil acesso, podendo ser utilizadas amostras muito pequenas de 1µL e 2µL.

Para verificar o grau de pureza das amostras foi realizada uma análise de quantificação. A leitura do grau de pureza OD 260/280 indica a relação entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídas. Segundo Brown (2003) esse valor deve-se encontrar entre 1,8 e 2,2. Já a leitura OD 260/230 indica que pode haver contaminação com diversos compostos: fenóis, guanidina, carboidratos e proteínas. De acordo com Fang *et al.* (1992) o resultado de uma boa leitura está entre 1,6 e 1,9.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração foi realizada a avaliação quantitativa das amostras obtendo-se os resultados descritos abaixo nas Tabelas 1 e 2, seguindo o protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) com alterações, a partir de amostras (Am) de tecido foliar frescas e secas de *Phaseolus lunatus* L. (Feijão-fava). Resultados semelhantes de extração de DNA foram obtidos anteriormente para a espécie em estudo, promovendo um tempo mais reduzido (em um dia) para que este processo ocorra, segundo Lopes *et al.* (2021).

Tabela 1: Quantificação e análise da pureza dos DNAs extraídos baseados no protocolo Dellaporta *et al.* (1983) com alterações, a partir de amostras de tecido foliar fresco de acessos de *Phaseolus lunatus* L. (Feijão-fava).

Amostras	Ac. Nucléicos (ng/µl)	OD (260/280)	OD (260/230)
Am. 01	68,81	1,85	0,64
Am.02	87,75	1,83	0,86
Am.03	92,35	2,16	0,94
Am.04	101,27	2,54	0,54
Am.05	238,02	2,24	1,43
Am.06	1.259,30	2,27	1,94
Am.07	91,93	2,18	0,93
Am.08	1.336,27	2,22	1,96

Fonte: Autora (2023)

Seguindo os parâmetros de Brown (2003) observa-se que as amostras 01, 02, 03, 05, 06, 07, 08 estão de acordo com o padrão estabelecido para o grau de pureza 260/280. Apenas a amostra 04 não se enquadra no proposto sendo verificado um pequeno aumento, próximo do sugerido pelo autor. Conforme sugerido por Fang *et al.* (1992) com relação ao grau de pureza 260/230, os resultados alcançados foram inconclusivos, tendo apenas as amostras 06 e 08 alcançado o resultado esperado, mostrando que houve contaminação, possivelmente com fenóis, proteínas e carboidratos, e que não foi possível o isolamento do DNA durante o processo de extração.

No entanto este resultado, demonstra que as amostras quando utilizadas com o tecido foliar fresco, trazem resultados condizentes com o grau de pureza esperado, no que se refere a

quantidade de DNA extraído e com amostras que possuem graus de pureza variando entre 1,85 e 2,54, como segue Tabela 1, podendo ser consideradas adequadas para a próxima etapa de análise molecular, como por exemplo PCR.

Tabela 2: Quantificação e análise da pureza dos DNAs extraídos baseados no protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) com alterações, a partir de amostras de tecido foliar secas de acessos de *Phaseolus lunatus* L. (Feijão-fava).

Amostras	Ac. Nucléicos (ng/μl)	OD (260/280)	OD (260/230)
Am. 01	190,16	2,16	1,91
Am. 02	345,15	2,11	0,77
Am. 03	286,26	2,18	1,52
Am. 04	1.241,47	2,22	1,90
Am. 05	934,65	2,21	1,81
Am. 06	2.007,11	2,12	1,73
Am. 07	*	*	*
Am: 08	1.247,78	2,18	1,75

Fonte: Autora (2023)

*Amostra não visível

No Tabela 2 foi observado que nos parâmetros OD 260/280 todas as amostras se enquadram no sugerido por Brown (2003), onde para se obter uma boa qualidade de DNA livre de proteínas as mesmas devem ter resultados entre 1,8 e 2,2. Assim, observando a tabela acima observa-se que todas as amostras se encontram dentro desses parâmetros. Conforme Fang *et al.* (1992), a razão de pureza apresentada para as amostras 01, 04, 05, 06 e 08, obedeceram o sugerido pelos referidos autores. Isso significa que mais da metade das amostras obtiveram resultados esperados quanto ao proposto. As amostras 02 e 03 ficaram abaixo do recomendado. A amostra 07 com tecido foliar seco não obteve visualização, sugerindo pouca maceração da mesma no processo de extração do DNA, ou uma amostra já desgastada.

Beltrão *et al.* (2006), estabelece que na leitura de comprimento de onda 260/280, resultados abaixo de 1,8 indicam contaminação por proteínas, nos resultados obtidos na presente pesquisa, em ambos os quadros (1 e 2), notam-se que não houve nenhuma amostra que apresentasse resultado inferior ao estipulado, demonstrando, que não existiu esse tipo de impureza nas amostras.

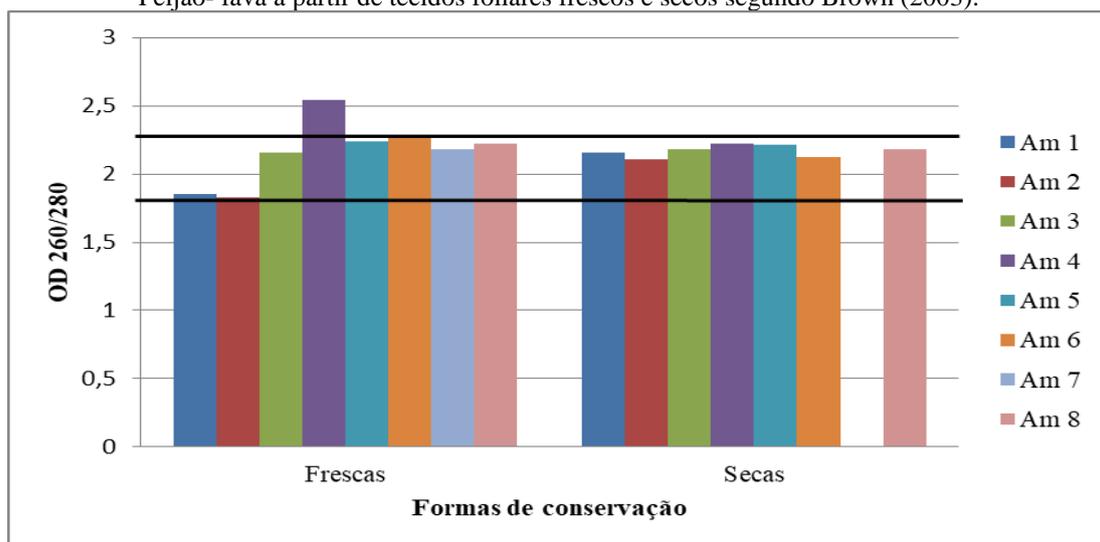
Com relação à quantidade de ácidos nucleicos obtidos, houve valores mais acentuados como observado nas amostras 6 e 8 na tabela 1 e nas amostras 4, 6 e 8 na tabela 2. Os mesmos quando avaliados com relação à absorbância das amostras, se encontram dentro dos parâmetros sugeridos pelos autores. Assim, não é observada relação direta entre a quantidade de DNA obtida e sua qualidade. Verificando as demais amostras, não foi identificado nenhum

padrão ao analisar a quantidade de ácidos nucleicos e o resultado de sua pureza. Como mencionado anteriormente, em se tratando da razão entre as leituras 260/230, foi observado uma maior quantidade de impurezas, presumivelmente por fenóis, proteínas e carboidratos, mas que ainda assim, não estão associados com a quantidade de ácidos nucleicos encontrados.

Nos resultados obtidos, a quantidade de ácidos nucleicos alcançados nas amostras da tabela 2, referentes a extração com folhas secas de *Phaseolus lunatus* L. foram maiores que os obtidos na extração com folha fresca como observado na tabela 1.

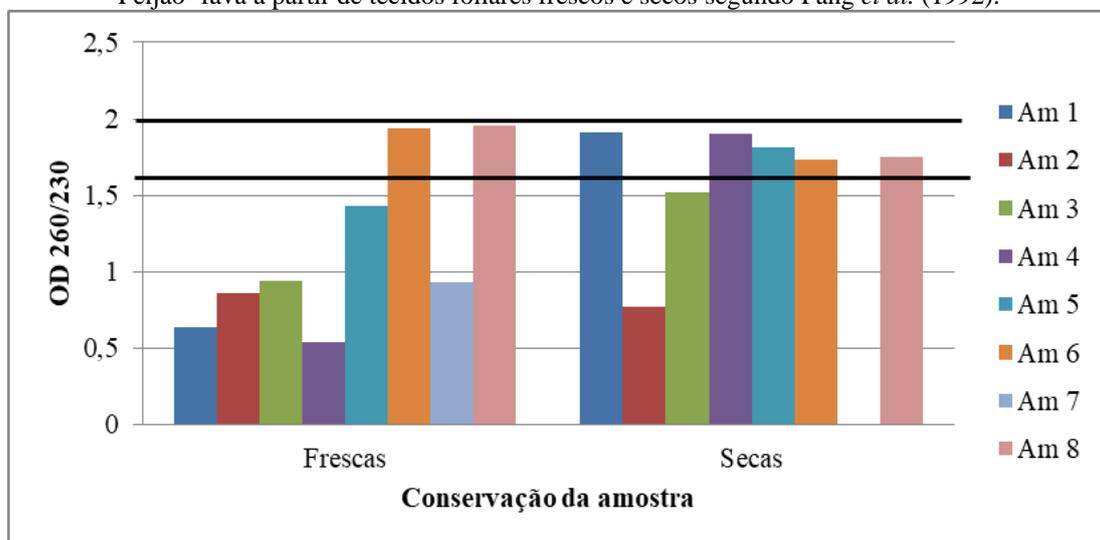
Abaixo encontram-se as figuras 1 e 2 comparando as duas formas de conservação dos tecidos foliares testados, onde é possível observar a quantidade de amostras que atingiram o grau de pureza desejado. Os traços que se encontram na figura citada estão dentro dos valores 1,8 e 2,2, indicado como valor do limiar padrão de pureza segundo Brown (2003) e na figura 2, de 1,6 e 1,9 como sugerem Fang *et al.* (1992), para o mesmo neste comprimento de onda.

Figura 1: Comparação entre os graus de pureza na absorvância 260/280 da extração de DNA, das amostras de Feijão- fava a partir de tecidos foliares frescos e secos segundo Brown (2003).



Fonte: Autora (2024)

Figura 2: Comparação entre os graus de pureza na absorvância 260/230 da extração de DNA, das amostras de Feijão- fava a partir de tecidos foliares frescos e secos segundo Fang *et al.* (1992).



Fonte: Autora (2024)

As figuras 1 e 2 apresentam uma melhor visualização sobre o resultado da quantificação, demonstrando os resultados obtidos da absorbância das amostras estando dentro dos valores de referência sugeridos por Brown (2003) e Fang *et al.* (1992). Ressalta-se, que as duas formas de coleta e conservação podem ser utilizadas, no entanto, esta pesquisa, mostrou que a forma de conservação da folha seca, configurou-se como mais um método que corrobora com a extração de DNA na espécie *Phaseolus lunatus* L..

Como foi constatado na presente pesquisa, ambas as formas de conservação das folhas de Feijão-fava, para fins de extração de DNA utilizando protocolo modificado de Dellaporta (1993), evidenciaram resultados coerentes com os parâmetros indicados na literatura consultada de (Brown (2003), Fang *et al.* (1992) e Beltrão *et al.* (2006)), quando observado a razão de pureza 260/280. Quanto ao valor de absorbância de 260/230, as amostras que foram conservadas secas se destacaram, visto que todas as amostras se encontraram dentro do sugerido por Brown (2003) e Fang *et al.* (1992).

CONCLUSÃO

Conclui-se, então, pelos resultados apresentados que o tecido foliar seco é o mais recomendado para a extração de DNA de *Phaseolus lunatus* L. (Feijão-fava) quando comparado com o tecido foliar fresco.

REFERÊNCIAS

- AMABILE, Renato Fernando; VILELA, Michelle Souza; PEIXOTO, José Ricardo. **Melhoramento de Plantas variabilidade genética, ferramentas e mercado: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Brasília, DF: SBMP, 2018. 108 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/185597/1/Melhoramento-de-plantas.pdf>. Acesso em: 30 maio 2024.
- AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 212 p.; il. 2003.
- BELTRÃO, F.A.S.; SILVA, D.S.; LAMOCA-ZARATE, R.M.; FELIX, L.P.; BELTRÃO, A.E.S. **Avaliação da Diversidade Genética Através de RAPD de Acessos de Maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoffm) e de duas Espécies Afins de Interesse Forrageiro**. Revista Caatinga — ISSN 0100-316X. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Caatinga (Mossoró, Brasil), v.20, n.2, p.118-126, abril/junho 2006.
- BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 376p. 2003.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. **A plant minipreparation: version II**. Plant Molecular Biology Report, v. 1, n. 4, p. 19-20, Sept. 1983
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; HORTORIUM, L. H. B. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.
- FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. **A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA**. Biotechniques, v. 13, n. 1, p. 52-54, jul. 1992.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220p. Disponível em: <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00063810.pdf>. Acesso em: 05 de maio de 2024.
- FEITOSA, A. G. S.; MARCO, C. A.; SANTOS, H. R.; SILVA, C. S.; FEITOSA, J. V. **Diagnóstico sócio-econômico e tecnológico do setor agrícola em alguns municípios da região do cariri cearense**. Holos. Ano 28, v. 1, 2011.
- JUNQUEIRA, S.F.; OLIVEIRA, E.A. de; MASCARENHAS, R. de J. **Caracterização físico-química da fava rajada (*Phaseolus Lunatos* L.) cultivada no sertão da Paraíba**. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 5., 2010, Maceió. Anais. Maceió: [IFAL], 2010. p.1-7.
- KASVI. **Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções**. 16 fev. 2018. Disponível em: <https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>. Acesso em: 27/05/2024.
- LOPES, J. R. de S., PINHEIRO, Y. V. F., MAGALHÃES, A. G., & CAMPOS, F. L. (2021). **Comparação de protocolos de extração de DNA em Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. Brazilian Journal of Development. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/34018>> Acessado em: 03 de maio 2024

- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.
- MARTINS, S. da S. de O.; BARBOSA, A. M. **Metodologia de coleta e extração de DNA da Acariquara-Branca (*geissospermum urceolatum* a.h. Gentry, 1984), no município de Manacapuru, km 60 – comunidade Nova Esperança**. Brazilian Journal of Development, 15 set. 2020. DOI 10.34117/bjdv6n9-383. Disponível em: <file:///C:/Users/user/Downloads/admin,+383.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2024.
- NOBRE D. A. C.; JUNIOR, D. S. B. **Feijão- Fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. Revista Cultivar, 2011.
- PEREIRA, G. S.; PINHO, E. V. de R. VON; PADINHA, L.; VILELA, L. DE R.; CARVALHO, B. L.; PINHO, I. V. VON. **COLETA DE FOLHAS DO CAFEEIRO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE ALTA QUALIDADE. VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2009. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio6/334.pdf. Acesso em: 08 de abril de 2024
- ROCHA, V. D. DA, ZÓRTEA, K. ÉVELIN M., CARDOSO, E. DOS S., BISPO, R. B., TIAGO, A. V., & ROSSI, A. A. B. (2018). **Efeito da idade da folha na qualidade do DNA extraído de *Piper aduncum* L.** *Revista De Ciências Agro-Ambientais*, 15(2), 218–222. <https://doi.org/10.5327/rcaa.v15i2.2072>. Disponível em: <https://periodicos.unemat.br/index.php/rcaa/article/view/2072/2314>. Acesso em: 11 de abril de 2024

**ANEXO- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *DISCIPLINARUM SCIENTIA*.
SÉRIE: CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLÓGICAS**

Na Revista *Disciplinarum Scientia* - Série: Ciências Naturais e Tecnológicas são aceitos para publicação **artigos científicos, tecnológicos e de extensão, revisões bibliográficas, notas e textos especiais.**

1. Os trabalhos devem ser redigidos no Microsoft Word com espaçamento simples, margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5 cm, fonte Times New Roman tamanho 12; folhas paginadas no lado inferior direito. O máximo de páginas será 15 para artigo, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota e texto especial, incluindo tabelas, quadros, gráficos e figuras. Figuras devem ser enviadas em arquivo separado em formato jpg, png ou tiff. Tabelas, quadros e gráficos não poderão estar com apresentação paisagem e devem ser enviados em arquivos editáveis do Microsoft Word ou Excel. Os créditos acadêmicos (tipo de trabalho, autor, coautor, colaborador, co-orientador, orientador - todos com respectiva instituição e e-mail) devem constar em nota de rodapé.

1.1 Artigo (inclui Estudo de Caso)- O artigo deve conter Título; Resumo; Palavras-chave; Introdução; Revisão de Literatura (de preferência incluída na Introdução); Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão ou Considerações Finais; Agradecimento(s) (se houver); Referências.

1.2. Revisão bibliográfica- A Revisão deve conter Título; Resumo; Palavras-chave; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Agradecimento(s) (se houver); Referências.

1.3. Nota - A Nota deve conter Título; Resumo; Palavras-chave; Texto (sem subdivisão, porém com introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusão. Pode conter tabelas e/ou figuras); Agradecimento(s) (se houver); Referências.

1.4. Texto especial (incluem Relatos de pesquisas e de experiências profissionais, Entrevistas e outros)- O Texto Especial deve conter Título; Resumo; Palavras-chave; Introdução; Material e Métodos; Desenvolvimento; Conclusão; Referências.

2. O Título do manuscrito, com no máximo duas linhas, deve ser centralizado e em negrito, com letras maiúsculas, redigido em dois idiomas, sendo um deles o inglês. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário.

3. O Resumo deve ser redigido em dois idiomas, sendo um deles o inglês, com título em letras maiúsculas e alinhado à esquerda, em bloco único no qual contenha, no máximo, 250 palavras, contendo objetivo, metodologia, resultados e conclusão (se for o caso). Não poderá conter fórmulas matemáticas, citações, ilustrações e tabelas.

4. As Palavras-chave devem ser incluídas logo após o texto do Resumo, em negrito, com inicial maiúscula e alinhamento à esquerda, contendo de três a cinco termos, os quais não devem constar no título, separados por vírgula e em ordem alfabética.

5. Os itens devem ser alinhados à esquerda, redigidos da seguinte forma: item primário - todo em maiúsculas e negritas; item secundário - todo em maiúsculas sem negrito; item terciário só a inicial maiúscula, em negrito; e item quaternário - só a inicial maiúscula, vem itálico.

6. As siglas e abreviaturas, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, devem ser colocadas entre parênteses, precedidas do nome por extenso.

7. As ilustrações (gráfico, desenho, organograma, fotografia, mapa, quadro, etc.) têm suas identificações na parte superior, compostas de designação (Gráfico, Figura, Quadro, Tabela, etc.), de acordo com a NBR 2013.01 da ABNT.

8. No caso de imagem (ns) de pessoa(s), o(s) autor(es) deve(m) anexar ao trabalho uma autorização para uso dela(s).
9. As citações e as Referências devem ser redigidas de acordo com a ABNT. As Referências devem restringir-se às obras citadas no texto, sendo que na RDS utiliza-se o negrito ao destacar a referência.
10. Os trabalhos aprovados são publicados em ordem de submissão e aprovação. Aqueles não aprovados são devolvidos ao orientador, acompanhados de um parecer.
11. **A responsabilidade por erros gramaticais é exclusivamente do(s) autor (es). Solicita-se que enviem a versão final do trabalho para revisão gramatical e linguística, quando solicitado pela Revista, e informem o nome do revisor. A redação do trabalho deve ser escrita no impessoal.**
12. O envio de originais implica, automaticamente, a cessão dos direitos autorais à Revista *Disciplinarum Scientia*.
13. Os nomes e e-mails informados serão usados, exclusivamente, para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.
14. Os casos omissos serão resolvidos pela Comissão Editorial.